

# Any role for *Chlamydia pneumoniae* in ischaemic stroke?

Citation for published version (APA):

Voorend, J. M. (2005). *Any role for Chlamydia pneumoniae in ischaemic stroke?* [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20051213jv>

## Document status and date:

Published: 01/01/2005

## DOI:

[10.26481/dis.20051213jv](https://doi.org/10.26481/dis.20051213jv)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary



## Summary

Atherosclerosis is defined as an inflammatory, immune-mediated disorder, which develops following endothelial injury. Causes of endothelial injury include hypertension, smoking and elevated homocysteine. One of the factors implicated in the pathogenesis of atherosclerosis is infection, more specifically infection with *C pneumoniae*. Extensive research has been done in the area of infections and atherosclerosis of the coronary arteries; atherosclerosis of the (pre-) cerebral vessels has received less attention in this respect. In both areas results and opinions about the role of *C pneumoniae* in vascular events have been controversial. In this thesis we aim to answer questions on the association between *C pneumoniae* infection and (pre-) cerebral vascular disease.

In **chapter 2** we describe the presence of anti-Chlamydia antibodies in patients with an ischaemic stroke under the age of fifty. Immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies are produced after each infection, and the presence anti-Chlamydia IgG and IgA antibodies therefore is proof of a prior infection. This study included 41 patients, with atherosclerosis as the probable cause of the stroke, and 55 healthy controls. The presence of IgG and IgA antibodies was determined in the serum of these patients. We found that IgA antibodies against *C pneumoniae* were more prevalent in patients with ischaemic stroke than in the healthy controls (crude OR: 2.1; 90% CI 1.1-9.5,  $p = 0.04$ ). After adjusting for hypertension, smoking and hypercholesterolaemia, positive Chlamydia antibodies remained associated with stroke (adjusted OR: 2.8, 90% CI 1.1-7.1,  $p = 0.04$ ).

In **chapter 3** we describe a mouse experiment, issued to address the question whether *C pneumoniae* could enter the brain after an intraperitoneal injection, and whether the presence of *C pneumoniae* caused microglial activation. Microglial cells are the immune effector cells of the brain, and they respond to infection, trauma and ischaemia. Activation of microglial cells leads to the production of potentially neurotoxic agents such as tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin (IL)-1 beta (IL-1 $\beta$ ). The presence of activated microglial cells has been described in conditions such as Alzheimer's disease, and in areas of chronic cerebral ischaemia. Furthermore, we investigated whether *C pneumoniae* infection leads to a higher permeability of the blood brain barrier, the natural protection wall of the brain against micro-organisms and toxic agents. For this purpose we used three types of mice: mice with atherosclerosis, i.e. Apolipoprotein E (ApoE) knockout (KO) and ApoE/Low Density Lipoprotein receptor (ApoE/LDLr) KO mice both on a C57BL/6J background, and mice without atherosclerosis, i.e. wild type C57BL/6J mice.

Using a highly sensitive polymerase chain reaction, we could detect *C pneumoniae* DNA in the brain tissue of 30% of the infected mice. The number of infected mice was the highest shortly after infection (3 days) and declined in the three weeks after infection. The permeability of the blood brain barrier was not altered in the infected mice. Activated microglial cells were visualized using immunohistochemistry. We found a significant increase in the number of activated microglial cells in the brains of *C pneumoniae* PCR positive ApoE/LDLr KO mice, compared to mock-infected mice. There were no differences in microglial activation between the *C pneumoniae* infected *C pneumoniae* PCR negative mice and to the mock-infected mice. Furthermore we observed a higher number of activated microglia in atherosclerotic mice compared to non-atherosclerotic mice. We concluded that intraperitoneal injection of *C pneumoniae* leads to cerebral infection, and in the susceptible mouse, this leads to microglial activation.

Ischaemic cerebrovascular disease can be divided in two entities. Large vessel disease, which is due to atherosclerosis of the larger cerebral vessels, causes mainly larger, usually called territorial infarcts, which often involve the cortex. Small vessel disease causes small infarcts, less than 15 mm in diameter on cerebral imaging, which are located in the deep brain structures (basal ganglia and internal capsule) or the pons; these are often referred to as lacunar infarcts. Small vessel disease is also the cause of more diffuse damage to the white matter of the brain: leukoaraiosis. *C pneumoniae*, Cytomegalovirus (CMV) and Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1) have been linked to large vessel atherosclerosis, and have been detected in brain tissue. The role of these micro-organisms in cerebral small vessel disease however, is still unknown. In **chapter 4** we describe the post-mortem presence of *C pneumoniae*, CMV and HSV-1 in the cerebral large vessels, small vessels and brain tissue of patients who died from various causes. In the majority of these cases, signs of large vessel disease and small vessel disease were present; in most cases this was asymptomatic. A PCR was performed on paraffin embedded tissue, to establish the presence of DNA of the above mentioned micro-organisms. Subsequently immunohistochemistry was used on adjacent paraffin slides to locate the micro-organisms within the brain tissue. Using the PCR method, we found no evidence of the presence of *C pneumoniae*, CMV, or HSV-1 in any of the cerebral large vessels. We found *C pneumoniae* in the brain tissue (periventricular white matter) of one case and CMV in the brain tissue (basal ganglia) of another case. By immunohistochemistry, the presence of CMV in the PCR positive sample could not be confirmed. *C pneumoniae* was present in ganglion cells and underneath the basal membrane of an arteriole. We concluded that, even though signs of large and small vessel disease were present in most cases, the presence of

the above mentioned micro-organisms was minimal. *C pneumoniae*, CMV and HSV-1, therefore do not seem to play an important role in (asymptomatic) cerebral large vessel and small vessel disease.

The chapters 5, 6 and 7 are clinical studies, using a patient population derived from the ACSI study (Azithromycin for the prevention of the progression of Cerebral ischaemic lesions in patients Surviving a non-cardio embolic cerebral Infarct), which investigates the effect of a three-month treatment schedule of azithromycin on ischaemic cerebral damage progression measured at two years.

In **chapter 5**, 149 patients are divided into two groups, patients with a cortical infarct or a single symptomatic lacunar infarct were assigned to the large vessel disease group, and patients with asymptomatic lacunar infarcts and leukoaraiosis were assigned to the small vessel disease group. *C pneumoniae* and inflammatory parameters such as high sensitive C-reactive protein (hsCRP) and cytokines such as IL-6 have been linked to cerebral large vessel disease, but it is unclear whether *C pneumoniae* infection and inflammation are related to small vessel disease, especially to the chronic, progressive type which results in silent lacunar infarcts and leukoaraiosis (silent brain lesions: SBL). For this purpose, we investigated the relation between the presence of *C pneumoniae* IgG antibodies, and inflammatory parameters (tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 and IFN $\gamma$ ) and the presence of SBL on magnetic resonance imaging of the brain. Inflammatory markers did not differ between patients with and without silent brain lesions, nor did the presence of *C pneumoniae* antibodies. Furthermore, inflammatory markers were not different in patients with and without *C pneumoniae* antibodies. Therefore, we concluded that *C pneumoniae* infection is not related to cerebral small vessel disease.

Common carotid intima-media thickness (CCA-IMT) can be assessed non-invasively by B-mode ultrasonography. Increases in IMT are associated with an increased risk of myocardial infarction and stroke, but this has only been investigated in large population based studies in healthy individuals. The same thing is true for the relation between *C pneumoniae* infection and inflammatory markers and CCA-IMT. It is unknown whether CCA-IMT is a predictive factor in a selected population of stroke patients, and how CCA-IMT is related to stroke subtype. In **chapter 6**, we sought to find out whether CCA-IMT is related to stroke subtype, and the presence of ipsilateral SBL on MRI. Furthermore, we investigated the relation between serum inflammatory parameters, *C pneumoniae* serology, and CCA-IMT. In our patient population (N=75), there were no differences in mean CCA-IMT with regard to the presence of ipsilateral

SBL. Furthermore, we found that, in a selected population of stroke patients, CCA-IMT was not related to *C pneumoniae* serology and inflammatory parameters. We concluded that CCA-IMT values are not different in the different stroke subtypes and are not related to the presence of SBL, in a population of patients with a symptomatic stroke. Furthermore, CCA-IMT is not related to *C pneumoniae* serology, or inflammatory parameters.

In **chapter 7**, we investigated whether treatment with azithromycin, an antimicrobial and anti-inflammatory agent, reduced *C pneumoniae* induced cytokine production by blood mononuclear cells. For this purpose levels of the cytokines TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 and IFN $\gamma$  were assessed in mononuclear cells. These cells were stimulated with *C pneumoniae* antigen, and subsequently, cytokine levels were assessed in the supernatant. The cytokine levels of 75 patients, which had been randomised in the ACSI trial, were assessed, before and after treatment. The patients were randomised to receive either azithromycin 500 mg or a matching placebo once daily for 3 days, then once weekly for twelve weeks. Blood was drawn at randomisation and at three months, after finishing the course of study medication. After three months of treatment, there were no significant differences in cytokine levels in the supernatant of *C pneumoniae* stimulated cells between the two treatment groups. Furthermore, when we measured the changes in the cytokine levels before and after treatment, we found no significant differences in changes in the cytokine levels, between the two patient groups. We concluded that azithromycin does not influence *C pneumoniae* induced cytokine production of mononuclear cells.

In this thesis the relation between *C pneumoniae* infection and ischaemic stroke is addressed from different directions. The animal experiment showed that *C pneumoniae* can infect the brain through haematogenic spread and, that cerebral infection with *C pneumoniae* causes microglial activation in susceptible animals. Furthermore, we found anti-Chlamydia IgA antibodies more often in young patients with ischaemic stroke than in controls. In spite of the above mentioned results, we conclude that there is no significant role for *C pneumoniae* infection in ischaemic stroke. The presence of *C pneumoniae* in cerebral vessels and brain tissue is scarce, and in several clinical studies we found no relation between *C pneumoniae* infection and SBL, nor was *C pneumoniae* infection or inflammation related to CCA-IMT. Furthermore, there was no effect of azithromycin on *C pneumoniae* induced cytokine production of mononuclear cells.

Samenvatting





## Samenvatting

Atherosclerose is een chronisch progressief inflammatoir proces, waarbij algemeen aangenomen wordt dat endotheelschade aan de basis van dit proces ligt. Verschillende oorzaken voor deze endotheelschade zijn al bekend, zoals hypertensie, roken en een verhoogd homocysteïne gehalte. Infecties, vooral infecties met *C pneumoniae*, worden ook genoemd als mogelijke bijdragers aan het proces van atherosclerose. In het verleden is uitgebreid onderzoek verricht naar de relatie tussen *C pneumoniae* infectie en atherosclerose van de coronair vaten; de cerebropetale vaten zijn hierin onderbelicht gebleven. De resultaten van studies op dit terrein die werden beschreven door diverse onderzoekers waren zeer tegenstrijdig; sommigen vonden een duidelijke relatie tussen *C pneumoniae* infectie en atherosclerose, anderen vonden deze relatie juist niet. Dit proefschrift probeert de vraag of er een relatie is tussen *C pneumoniae* infectie en cerebrovasculaire ischemie te beantwoorden.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we de relatie tussen de aanwezigheid van imuunglobuline (Ig) G en IgA antilichamen tegen *C pneumoniae* in patiënten met een herseninfarct op jonge leeftijd, in vergelijking met gezonde controles. IgG en IgA antilichamen worden geproduceerd na iedere infectie en de aanwezigheid van anti-Chlamydia IgG en IgA antilichamen wijst derhalve op een doorgemaakte *C pneumoniae* infectie. In deze studie werden 41 patiënten geïncubeerd die jonger waren dan 50 jaar en een herseninfarct hadden doorgemaakt, waarvan de meest waarschijnlijke oorzaak atherosclerose was. De aanwezigheid van IgG en IgA antistoffen werden bepaald in het serum van deze patiënten en dit werd vergeleken met het serum van 55 gezonde controles. We vonden dat IgA antistoffen tegen *C pneumoniae* vaker in de patiëntengroep voorkwamen dan in de controle groep (OR 2.1; 90% CI 1.1-9.5,  $p=0.04$ ). Ook na corrigeren voor factoren als hypertensie, roken, hypercholesterolemie en diabetes mellitus, was er nog een significante relatie tussen de aanwezigheid van IgA antistoffen tegen *C pneumoniae* en een herseninfarct op jonge leeftijd (gecorrigeerde OR: 2.8, 90% CI 1.1-7.1,  $p=0.04$ ).

In **hoofdstuk 3** wordt een muisexperiment beschreven. In dit experiment werd onderzocht of *C pneumoniae* de hersenen kan infecteren na intraperitoneale toediening en of deze infectie leidt tot een reactie, namelijk tot activatie van microglia cellen. Microglia cellen zijn de immuuncellen van de hersenen en deze cellen reageren op infectie, trauma of ischemie van de hersenen. De activatie van microglia cellen leidt tot de productie van verschillende cytokines zoals tumor necrosis factor alpha ( $TNF\alpha$ ) en interleukine 1 bèta ( $IL-1\beta$ ). Deze stoffen zijn potentieel neurotoxisch. De aanwezigheid van geactiveerde

microglia cellen is reeds beschreven bij de ziekte van Alzheimer en in gebieden van de hersenen die zijn blootgesteld aan chronische ischemie. Daarnaast werd gekeken of *C pneumoniae* infectie werd veroorzaakt door, of leidde tot een verhoogde doorlaatbaarheid van de bloed-hersenen barrière. De bloed-hersenen barrière is de natuurlijke beschermer van de hersenen tegen schadelijke stoffen in de circulatie. Een verhoogde doorlaatbaarheid van deze bloed-hersenen barrière kan ertoe leiden dat de hersenen worden bloot gesteld aan deze schadelijke stoffen. Om deze vragen te beantwoorden werden drie typen muizen geïnfecteerd, namelijk muizen met atherosclerose: de Apolipoproteïne E (ApoE) knockout (KO) en ApoE/Low Density Lipoprotein receptor (ApoE/LDLr) KO muizen en controle muizen, de C57BL/6J muizen. Met een zeer gevoelige polymerase ketting reactie test werd het DNA van *C pneumoniae* gevonden in 30% van de geïnfecteerde muizen. Het aantal geïnfecteerde muizen was het hoogst drie dagen na de intraperitoneale injectie. Uit het onderzoek bleek ook dat de bloed-hersenen barrière niet was aangetast na infectie. De activatie van microglia cellen werd in beeld gebracht door een immunohistochemische kleuring. Hierbij vonden we in de hersenen van de geïnfecteerde ApoE/LDLr KO muizen significant meer geactiveerde microglia cellen dan in de niet geïnfecteerde ApoE/LDLr KO muizen. Daarnaast bleken de ApoE/LDLr KO muizen meer geactiveerde microglia cellen te hebben dan de C57BL/6J muizen. We concludeerden dat intraperitoneale injectie van *C pneumoniae* leidt tot een cerebrale infectie, die in de muizen met atherosclerose leidde tot een verhoogd aantal geactiveerde microglia cellen.

Het herseninfarct kan worden ingedeeld in twee groepen: large vessel disease en small vessel disease. Large vessel disease staat voor de atherosclerose van de grotere hersenvaten; waardoor de grotere zogenaamde corticale herseninfarcten worden veroorzaakt. Small vessel disease staat voor vaatwandveranderingen in de kleinere hersenvaten, het type infarct wat hierbij wordt gezien is de zogenaamde lacunaire infarct. Lacunaire infarcten zijn niet groter dan 15 mm in doorsnede en worden vooral gezien in de diepere hersenstructuren zoals de capsula interna en de basale ganglia. Daarnaast wordt small vessel disease geassocieerd met chronische progressieve afwijkingen zoals stille lacunaire infarcten en leukoaraïosis ("silent brain lesions" = SBL). *C pneumoniae*, Cytomegalovirus (CMV) en Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1), zijn allen in verband gebracht met atherosclerose en zijn allen eerder aangetoond in hersenweefsel. Echter, de rol van deze micro-organismen in de vaatwandveranderingen van de kleine hersenvaten is nog nooit eerder beschreven. In **hoofdstuk 4** beschrijven we de onderzoek naar aanwezigheid van *C pneumoniae*, CMV en HSV-1 in de grote hersenarteriën,

de kleine hersenvaten en hersenweefsel, dat is verkregen bij obductie van mensen die waren overleden aan diverse oorzaken.

De polymerase ketting reactie werd hier uitgevoerd op weefsel wat gefixeerd was in formaline en daarna ingebed in paraffine. Daarnaast werd op weefsel waar een van de micro-organismen werd gevonden een immuno-histochemische kleuring toegepast om de locatie van het micro-organisme aan te tonen. Met de polymerase ketting reactie werd in slechts twee casus DNA gevonden van *C pneumoniae* (in de periventriculaire witte stof) en CMV (in de basale kernen). Geen van de micro-organismen werd aangetoond in de grote hersenarteriën, hoewel in bijna alle hersenarteriën tekenen van atherosclerose werden gezien. Met immunohistochemie konden alleen *C pneumoniae* antigenen worden aangetoond; deze bevonden zich in de ganglion cellen van de hersenen en onder de basale membraan van een hersenarteriole. Hieruit concludeerden we dat ondanks dat er in het merendeel van de weefsels aanwijzingen werden gevonden voor atherosclerose, arteriolosclerose en ischemische hersenschade, de aanwezigheid van de bovengenoemde micro-organismen minimaal was. Deze micro-organismen lijken dus geen rol te spelen in asymptomatische ischemische hersenschade en vaatwandveranderingen.

In hoofdstuk 5 werden 149 patiënten verdeeld in twee groepen: patiënten met corticale infarcten en één enkel symptomatisch lacunair infarct werden ingedeeld in de groep large vessel disease en patiënten met stille lacunaire infarcten en leukoaraiosis werden ingedeeld in de small vessel disease groep. *C pneumoniae* antistoftiters en inflammatoire parameters zoals high sensitive C-reefief proteïne (hsCRP) en cytokines als IL-6, worden in het algemeen geassocieerd met atherosclerose van de grote cerebrale vaten. Het is onduidelijk of *C pneumoniae* infectie en inflammatie ook een rol spelen in het ontstaan van small vessel disease en de of *C pneumoniae* infectie gerelateerd is aan de aanwezigheid van asymptomatische ischemische laesies zoals stille lacunaire infarcten en leukoaraiosis (SBL). Hiertoe onderzochten we de relatie tussen de aanwezigheid van *C pneumoniae* IgG antilichamen en inflammatoire parameters in het serum (hsCRP, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, en IFN $\gamma$ ) en de aanwezigheid van SBL op de magnetische resonantie scan (MRI) van de hersenen. Het resultaat van dit onderzoek was dat er geen verschil gevonden werd in inflammatoire parameters tussen de groep patiënten met en zonder SBL, ook de aanwezigheid van *C pneumoniae* IgG antilichamen verschilde niet tussen beide patiëntengroepen. *C pneumoniae* infectie is dus niet gerelateerd aan cerebrale small vessel disease.

Het meten van de intima-media dikte van de arteria carotis communis (CCA-IMT) is een veilig en non-invasief onderzoek. Het is alom bekend dat de dikte

van de CCA-IMT gerelateerd is aan het risico op het krijgen van een vasculair event. Dit is echter alleen beschreven in grote studies in gezonde patiënten populaties. Hetzelfde geldt voor de relatie tussen inflammatoire parameters en de dikte van de CCA-IMT. Het is niet bekend of de CCA-IMT in een selecteerde patiëntenpopulatie ook een voorspellende factor is. Tevens zijn data over de relatie tussen CCA-IMT en de verschillende subtypen van het herseninfarct spaarzaam. Zoals beschreven is in **hoofdstuk 6** onderzochten we of de CCA-IMT gerelateerd is aan de aanwezigheid van ipsilaterale SBL. Dit werd vervolgens gerelateerd aan de aanwezigheid van *C pneumoniae* IgG antistoffen en inflammatoire parameters in het bloed. In onze patiëntenpopulatie (N = 75) vonden we geen verschillen in de gemiddelde CCA-IMT waarden in de aan- en afwezigheid van ipsilaterale SBL. Verder vonden we in een populatie die exclusief bestond uit patiënten met een herseninfarct geen relatie tussen de dikte van de CCA-IMT, inflammatoire parameters en *C pneumoniae* serologie.

In **hoofdstuk 7** beschrijven we het effect van een drie maanden durende antibiotica kuur met azithromycine op de cytokine productie van mononucleaire cellen in het bloed. In dit experiment werden de mononucleaire cellen gestimuleerd met *C pneumoniae* antigeen, waarna de productie van de cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 en IFN $\gamma$  werd gemeten in het supernatant. Van 75 patiënten die deelnamen aan het ACSI onderzoek werd bloed afgenomen voor en na de azithromycine inname. De patiënten waren bij loting in twee groepen verdeeld en kregen azithromycine of een placebo: 500 mg per dag gedurende de eerste drie dagen, en 500 mg per week voor een periode van twaalf weken. Na drie maanden was er geen verschil in de bloedspiegel van de cytokines tussen beide patiëntengroepen. Daarnaast werd gekeken naar het verschil in bloedspiegels van de cytokines voor en na de behandeling, ook hier werd geen verschil gevonden. Uit dit onderzoek kan worden geconcludeerd dat azithromycine heeft geen effect op de cytokine productie van mononucleaire cellen die worden gestimuleerd met *C pneumoniae* antigeen.

In dit proefschrift werd op verschillende manieren gekeken naar een eventuele relatie tussen een infectie met *C pneumoniae* en herseninfarcten. Het diermodel liet zien dat *C pneumoniae* het brein kan infecteren en microglia activatie veroorzaakt, zoals ook wordt gezien bij chronische ischemie van de hersenen. Jonge patiënten met een herseninfarct hadden vaker anti-Chlamydia IgA antistoffen dan gezonde controles. Ondanks bovengenoemde resultaten lijkt er geen (grote) rol weggelegd voor *C pneumoniae* infectie in het ontstaan van cerebrale ischemie. De aanwezigheid van *C pneumoniae* in de hersenvaten en hersenweefsel bleek zeer minimaal te zijn en in de klinische

studies werd geen relatie gevonden tussen *C pneumoniae* serologie en de aanwezigheid van SBL op MRI en de dikte van de CCA-IMT. Daarnaast werd geen effect gevonden van behandeling met azithromycine op de cytokine productie van mononucleaire cellen.

